

# OCCURRENCE OF MYCOTOXINS IN ALFALFA (*Medicago sativa* L.), SORGHUM [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], AND GRASS (*Cenchrus ciliaris* L.) RETAILED IN THE STATE OF NUEVO LEÓN, MÉXICO

## OCURRENCIA DE MICOTOXINAS EN ALFALFA (*Medicago sativa* L.), SORGO [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Y ZACATE (*Cenchrus ciliaris* L.) EN VENTA AL MENUDEO EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO

Alejandra Huerta-Treviño, Jorge E. Dávila-Aviña, Eduardo Sánchez, Norma Heredia, Santos García\*

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Apartado Postal 124-F. San Nicolás, N. L., México. 66451. (santos@microbiosymas.com)

### ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by specific filamentous fungi that are common contaminants of agricultural commodities. These compounds are toxic to humans and animals, and they are a health problem worldwide. Mycotoxin-containing feeds can cause serious diseases in farm animals and substantial economic losses. Therefore, the objective of this study was to determine the occurrence and levels of six mycotoxins in three types of forage at retail in the state of Nuevo León, México. The hypothesis was that all types of forages were contaminated with at least one of the six mycotoxins analyzed. One hundred and twenty samples of alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], and grass (*Cenchrus ciliaris* L.) used for animal consumption were collected from farms and commercial locations in the state of Nuevo León, from June to November 2013, and January 2014. The total concentrations of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin, T-2/HT-2 toxins, and zearalenone were determined by enzyme-linked immunoassays using Neogen Veratox mycotoxin test kits. For data analysis, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. All forage types contained mycotoxins, although the alfalfa samples showed higher mean levels of aflatoxins ( $2.77 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), deoxinivalenol ( $470 \text{ mg kg}^{-1}$ ), ochratoxin ( $32.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), T-2/HT-2 toxins ( $93.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), and zearalenone ( $199.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Most samples were contaminated with more than two mycotoxins, which could be a risk for animal and human health. These data showed the need to establish appropriate control measures to reduce the risk of feed contamination, particularly when mixtures with forage susceptible to fungal contamination are used for feeding livestock.

### RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos específicos que son contaminantes comunes en productos agrícolas. Estos compuestos son tóxicos para humanos y animales, y un problema de salud en el mundo. Los alimentos con micotoxinas pueden causar graves enfermedades en animales de granja y pérdidas económicas sustanciales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las ocurrencias y niveles de seis micotoxinas en tres tipos de forraje vendidos al menudeo en el estado de Nuevo León, México. La hipótesis fue que todos los tipos de forraje estaban contaminados con al menos una de las seis micotoxinas analizadas. De junio a noviembre de 2013 y en enero de 2014, en granjas y comercios locales en el estado de Nuevo León, se recolectaron 120 muestras de alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] y zacate (*Cenchrus ciliaris* L.) usadas para consumo animal. Las concentraciones totales de aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxinas, toxinas T-2 y HT-2, y zearalenona se determinaron con inmunoensayos asociados a enzimas usando un kit de prueba de micotoxinas Neogen Veratox. Para el análisis de datos se usó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Todos los tipos de forraje contenían micotoxinas y las muestras de alfalfa mostraron niveles más altos de aflatoxinas ( $2.77 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), deoxinivalenol ( $470 \text{ mg kg}^{-1}$ ), ocratoxina ( $32.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), toxinas T-2 y HT-2 ( $93.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), y zearalenona ( $199.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). La mayoría de las muestras estaba contaminada con más de dos micotoxinas, que pueden ser un riesgo para la salud de animales y humanos. Los datos mostraron la necesidad de establecer medidas de control apropiadas para reducir los riesgos de contaminación en alimentos, en particular cuando se usa forraje susceptible a contaminación micótica para alimentar al ganado.

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: February, 2016. Approved: July, 2016.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 50: 825-836. 2016.

**Key words:** Mycotoxins, forages, aflatoxin, fumonisin, ochratoxin

## INTRODUCTION

Mycotoxins are metabolites produced by specific filamentous fungi that colonize several human foods and animal feeds (García and Heredia, 2013). Mycotoxins ingested by humans or animals can cause a toxic response referred as mycotoxicosis, with acute, subchronic, or chronic manifestations in animals (Streit *et al.*, 2013). The mycotoxins most frequent in animal feedstuffs include aflatoxins, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and T-2/HT-2 toxins (Bryden, 2012). Fungal growth and its ability to produce mycotoxins in forage is influenced by complex interactions of abiotic and biotic factors, such as the aggressiveness of the fungal species, host susceptibility, environmental factors (temperature or water availability), and agrotechnological systems (Alonso *et al.*, 2013).

Aflatoxins produced mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, are of greatest concern from a global perspective (Bhat *et al.*, 2010). When ingested, they can cause liver necrosis, acute toxicity, cancer, or even death in humans and animals (Duarte *et al.*, 2010). Corn (*Zea mays* L.), rice (*Oriza sativa* L.), sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], barley (*Hordeum vulgare* L.), rye (*Secale cereale* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), and cottonseed (*Gossypium hirsutum*) are used as animal feeds and are targets of contamination (Duarte *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2014).

Fumonisin, which are produced mainly by members of *Fusarium* and by some *Alternaria* species, occur frequently in corn and other cereals (Streit *et al.*, 2013). Fumonisin are associated with equine leukoencephalomalacia, hydrothorax, and porcine pulmonary edema syndrome (Bhatnagar and García, 2013); besides, they can affect the immune system (Streit *et al.*, 2013).

Ochratoxin A is produced by *A. alutaceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, and *Penicillium verrucosum* (García and Heredia, 2013). This toxin can be found in cereal grains, beans, peanuts, and meat (Pereira *et al.*, 2014), and it produces nephrotoxic, teratogenic, and hepatotoxic effects in certain animal species (García and Heredia, 2013).

Deoxynivalenol, also known as vomitoxin, is produced by *F. graminearum* and *F. culmorum* and is found on cereal crops worldwide (Wood, 1992).

**Palabras clave:** Micotoxinas, forrajes, aflatoxina, fumonisina, ocratoxinas.

## INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos producidos por hongos filamentosos específicos que colonizan varios alimentos de consumo humano y animal (García y Heredia, 2013). Las micotoxinas ingeridas por humanos o animales pueden causar una respuesta tóxica conocida como micotoxicosis, con manifestaciones graves, subcrónicas o crónicas en animales (Streit *et al.*, 2013). Las micotoxinas más frecuentes en los piensos animales incluyen las aflatoxinas, deoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas, ocratoxinas A, y toxinas T-2 / HT-2 (Bryden, 2012). El crecimiento de hongos y su habilidad para producir micotoxinas en el forraje está influenciado por complejas interacciones de factores bióticos y abióticos, como la agresividad de la especie de hongo, la vulnerabilidad del portador, factores ambientales (temperatura y disponibilidad de agua), y sistemas agrotecnológicos (Alonso *et al.*, 2013).

Las aflatoxinas producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, son de gran preocupación desde una perspectiva global (Bhat *et al.*, 2010). Al ser ingeridas pueden causar necrosis en el hígado, toxicidad aguda, cáncer, incluso la muerte en animales y humanos (Duarte *et al.*, 2010). El maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oriza sativa* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], cebada (*Hordeum vulgare* L.), centeno (*Secale cereale* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), y semilla de algodón (*Gossypium hirsutum*) se usan como alimento para animales y son blancos de contaminantes (Duarte *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2014).

Las fumonisinas, producidas principalmente por miembros del *Fusarium* y por algunas especies de *Alternaria*, se dan con frecuencia en el maíz y en otros cereales (Streit *et al.*, 2013). Las fumonisinas se asocian con la leucoencefalomalacia equina, hidrotórax, y síndrome de edema pulmonar porcina, (Bhatnagar y García, 2013); además, pueden afectar el sistema inmune (Streit *et al.*, 2013).

La ocratoxina A se produce por *A. alutaceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, y *Penicillium verrucosum* (García y Heredia, 2013). Esta toxina se puede encontrar en granos de cereales, frijoles, cacahuates y carne (Pereira *et al.*, 2014), y produce efectos nefrotóxicos, teratogénicos, y hepatotóxicos en ciertas especies de animales (García y Heredia, 2013).

In animal husbandry, this toxin alters the immune system (Streit *et al.*, 2013) and is associated with feed refusal as well as vomiting (Binder *et al.*, 2007).

Zearalenone is a nonsteroidal, estrogenic mycotoxin produced by *F. graminearum*, *F. culmorum*, and *F. heterosporum*, which are common contaminants of cereal crops worldwide (Wood, 1992; García and Heredia, 2013). This toxin is associated with reproductive problems in animals and probably in humans.

T-2/HT-2 toxins are produced mainly by *F. sporotrichoides*, *F. poae*, and other *Fusarium* species (Wood, 1992). They are associated with lethal toxicosis in dairy cattle that have consumed moldy corn (Wood, 1992; García and Heredia, 2013).

Contamination of feeds with mycotoxin occurs when the conditions are favorable for fungal growth. Animal production systems in temperate and arid or semi-arid regions, in México, rely on cattle systems representing more than 95 % of the value of ruminant products (Améndola *et al.*, 2006). The state of Nuevo León in northern México is located within one of the oldest and most established cattle feeding regions (Olsen *et al.*, 2006). Between 1993 and 2003, six northern Mexican states, which have an arid or semiarid climate in approximately 74 % of their territory, exported 0.91 million cattle per year to the USA, sharing 94 % of the national export of this type of product (Améndola *et al.*, 2006).

Mycotoxins in feeds are of both economic and health concerns because of the reduction of animal production and their accessibility to humans through animal products. To the best of our knowledge, no data in the scientific literature describe the levels of mycotoxins in feeds in the state of Nuevo León. Thus, the objective of this study was to determine the presence and levels of selected mycotoxins in alfalfa, sorghum, and grass retained in this state.

## MATERIALS AND METHODS

### Forage samples

One hundred and twenty forage samples (40 alfalfa, 40 sorghum, and 40 grass) were collected from farms and commercial locations of the metropolitan area of Monterrey (25° 40'17" N, 100° 18'31" W), Nuevo León, from June to November 2013 and January 2014. Samples were transported to the laboratory and processed within a week.

El deoxinivalenol, también conocido como vomitoxina se produce por *F. graminearum* y *F. culmorum* y se encuentra en cultivos de cereal en el mundo (Wood, 1992). En el ganado esta toxina altera el sistema inmune (Streit *et al.*, 2013) y se asocia con el rechazo al alimento y vómitos (Binder *et al.*, 2007).

La zearalenona es una micotoxina no esteroidea, estrogénica producida por *F. graminearum*, *F. culmorum*, y *F. heterosporum*, contaminantes comunes en los cultivos de cereal en el mundo (Wood, 1992; García y Heredia, 2013). Esta toxina se asocia con problemas reproductivos en animales y probablemente en humanos.

Las toxinas T-2/HT-2 se producen principalmente por *F. sporotrichoides*, *F. poae*, y otras especies del *Fusarium* (Wood, 1992). Están asociadas con toxicosis letal en vacas lecheras que consumieron maíz con moho (Wood, 1992; García and Heredia, 2013).

La contaminación de alimentos con micotoxinas ocurre cuando las condiciones son favorables para el crecimiento de hongos. Los sistemas de producción animal en regiones templadas y áridas o semiáridas, en México, dependen de sistemas de bovinos que representa 95 % del valor de productos rumiantes (Améndola *et al.*, 2006). El estado de Nuevo León en el norte de México está en una de las regiones más viejas y consolidadas de alimentación ganadera (Olsen *et al.*, 2006). Entre 1993 y 2003, seis estados del norte de México, con un clima árido o semiárido en aproximadamente 74 % de su territorio, exportaron 0.91 millones de reses por año a EE.UU., 94 % de la exportación nacional de este productos (Améndola *et al.*, 2006).

Las micotoxinas en alimentos son preocupaciones económicas y de salud por la reducción de la producción animal y su acceso a los humanos a través de productos de origen animal. Hasta donde sabemos, no existe información en literatura científica que describa los niveles de micotoxinas en alimentos en el estado de Nuevo León. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia y niveles de micotoxinas seleccionadas en alfalfa, sorgo y zacate vendidos al menudeo en este estado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de forraje

De junio a noviembre de 2013 y enero de 2014 se recolectaron 120 muestras (40 de alfalfa, 40 de sorgo y 40 de zacate) de

### Sample extraction

Forage samples (1 kg) were ground with a mechanical grinder and homogenized prior to extraction. To quantify total aflatoxins, fumonisin, T-2/HT-2 toxins, and zearalenone, 10 g of ground sample were mixed with 50 mL of methanol/water (7:3, v/v), and the mixture was shaken vigorously for 3 min. For ochratoxin extraction, samples (10 g) were mixed with 40 mL of methanol/water (1:1, v/v); and for deoxynivalenol extraction, samples (10 g) were mixed with 100 mL of distilled water. Samples were filtered through a Whatman No.1 paper, and the solution was used for mycotoxin determinations.

### Mycotoxin assays

Total aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin, T-2/HT-2 toxins, and zearalenone were quantified using Neogene mycotoxin kits (Veratox®). These kits are based on a direct, competitive enzyme-linked immunoassay, and the procedure used followed the manufacturer's instructions. Briefly, 100  $\mu$ L of the extracted sample and 100  $\mu$ L of horseradish peroxidase-conjugated solution (toxin-HRP) were added to wells of a microwell plate provided in the kit. Aliquots (100  $\mu$ L) were then transferred to wells coated with specific mycotoxin antibody, and the plate was incubated at room temperature for 2 min for aflatoxin quantification, 10 min for ochratoxin, and 5 min for the other toxins. The wells were washed five times with distilled water, and 100  $\mu$ L of K-Blue substrate solution was added. After incubation for 3–5 min at room temperature, the reaction was stopped by the addition of 100  $\mu$ L of Red Stop solution. The absorbance (650 nm) was measured using a NEOGEN®Stat Fax® 4700 microstrip reader. The mycotoxin concentrations were calculated using external standards for each mycotoxin provided by the kit (Roze *et al.*, 2013). The detection limit of the kit is 1.4 ppb, 0.1 ppm, 0.2 ppm, 1 ppb, 10 ppb for total aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin and zearalenone, respectively (determined by the mean average of 10 mycotoxin free sample plus two standard deviations; <http://foodsafety.neogen.com/en/veratox#mycotoxins>).

### Statistical analysis

Simple random sampling was used and each sample was analyzed in duplicate. The Kruskal-Wallis test was used to determine if all medians were equal ( $H_0$ ) or at least two medians were different ( $p \leq 0.05$ ), followed by Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value test (Dunn's Test) to know if the medians were significantly different. The Number Cruncher Statistical System version 6.0 software (NCSS, LLC) was used.

granjas y comercios locales en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (25° 40' 17" N, 100° 18' 31" O). Las muestras se llevaron al laboratorio y procesaron en una semana.

### Extracción de muestras

Las muestras de forraje (1 kg) se molieron con un molinillo mecánico y se homogenizaron antes de la extracción. Para cuantificar la cantidad total de aflatoxina, fumonina, toxinas T-2/HT-2, y zearalenona, se mezclaron 10 g de muestra pulverizada con 50 mL de metanol/agua (7:3 v/v), y la mezcla se agitó 3 min con vigor. Para extraer ocratoxina, la muestra (10 g) se mezcló con 40 mL de metanol/agua (1:1, v/v). Para extraer deoxynivalenol, la muestra (10 g) se mezcló con 100 mL de agua destilada. Las muestras se filtraron con papel Whatman No. 1, y la solución se usó para la resolución de micotoxinas.

### Análisis de micotoxinas

La cantidad total de aflatoxinas, deoxynivalenol, fumonisinas, ocratoxinas, toxinas T-2/HT-2 y zearalenona se cuantificaron usando kits de micotoxinas Neogene (Veratox®). Estos kits se basan en inmunoensayos directos y competitivos asociados a enzimas, y el procedimiento usó las instrucciones del fabricante. En breve, 100  $\mu$ L de la muestra extraída y 100  $\mu$ L de solución de peroxidasa de rábano picante (toxina HRP) se colocaron en los pozos de una placa proporcionada en el kit. Las alícuotas (100  $\mu$ L) se transfirieron a pozos cubiertos con anticuerpos específicos de micotoxinas, y la placa se incubó 3 min a temperatura ambiente para cuantificar aflatoxina, 10 min para ocratoxina, y 5 minutos para otras toxinas. Los pozos se lavaron 5 veces con agua destilada, y se agregaron 100  $\mu$ L de solución de substrato de K-Blue. Después de incubar de 3 a 5 min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción añadiendo 100  $\mu$ L de solución Red Stop. La absorbancia (650 nm) se midió usando un lector de tiras NEOGEN®Stat Fax® 4700. La concentración de micotoxinas se calculó usando parámetros externos para cada micotoxina proporcionada por el kit (Roze *et al.*, 2013). El límite de detección del kit es 1.4 ppb, 0.1 ppm, 0.2 ppm, 1ppb, 10 ppb para el total de aflatoxinas, deoxynivalenol, fumonisinas, ocratoxinas, y zearalenona, respectivamente (determinado por el promedio de 10 muestras libres de micotoxinas más dos desviaciones estándar; <http://foodsafety.neogen.com/en/veratox#mycotoxins>).

### Análisis estadístico

El muestreo fue aleatorio simple y cada muestra se analizó dos veces. Para determinar si todas las medias eran iguales ( $H_0$ ) o si por lo menos dos medianas eran diferentes ( $p \leq 0.05$ ) se usó

## RESULTS AND DISCUSSION

The mycotoxin levels in feeds ranged from not detectable (ND) to  $6.4 \mu\text{g kg}^{-1}$  for aflatoxin, ND to  $1.1 \text{ mg kg}^{-1}$  for deoxynivalenol, ND to  $1.82 \text{ mg kg}^{-1}$  for fumonisin, ND to  $273 \mu\text{g kg}^{-1}$  for ochratoxin, ND to  $139 \mu\text{g kg}^{-1}$  for T-2/H2 toxins, and ND to  $463.4 \mu\text{g kg}^{-1}$  for zearalenone. Alfalfa contained higher levels of mycotoxins, as compared to sorghum and grass. The average contents of aflatoxins, ochratoxin, deoxynivalenol, fumonisins, T-2/HT-2 toxins, and zearalenone present in alfalfa, sorghum, and grass are shown in Figure 1.

All samples showed multiple contaminations with mycotoxins, with at least two mycotoxins in the same sample. Alfalfa showed the highest incidence of multiple contaminations. The six mycotoxins analyzed were found in 15 of 40 alfalfa samples (37.5 %), whereas there was a lower frequency of contamination in samples of sorghum, 1 of 40 (2.5 %), and grass: 3 of 40 (7.5 %). Five mycotoxins were detected in 35 %, 40 %, and 25 % of alfalfa, sorghum, and grass samples, respectively. Four and three different mycotoxins were detected in 25 %, 32 %, and 20 % and 2.5 %, 25 %, and 20 %

la prueba Kruskal-Wallis. Para saber si las medianas eran significativamente diferentes se usó la prueba de comparación múltiple Kruskal-Wallis (Prueba de Dunn). El software usado fue The Number Cruncher Statistical System version 6.0 (NCSS, LLC).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de micotoxinas en los alimentos variaron de no detectable (ND) hasta  $6.4 \mu\text{g kg}^{-1}$  para aflatoxina, ND hasta  $1.1 \text{ mg kg}^{-1}$  para deoxinivalenol, ND hasta  $1.82 \text{ mg kg}^{-1}$  para fumonisin, ND hasta  $273 \mu\text{g kg}^{-1}$  para zearalenona. La alfalfa tuvo mayores niveles de micotoxinas en comparación con el sorgo y el zacate. En la Figura 1 se muestran las cantidades promedio de aflatoxinas, ocratoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, toxinas T-2/HT-2 y zearalenona presentes en alfalfa, sorgo y zacate.

Todas las muestras presentaron contaminación por micotoxinas (al menos dos micotoxinas en la misma muestra). La alfalfa tuvo la mayor incidencia de contaminación múltiple. Las seis micotoxinas analizadas se encontraron en 15 de 40 muestras de alfalfa (37.5 %), mientras que la menor frecuencia de contaminación fue en las muestras de sorgo, 1 de 40 (2.5 %) y zacate, 3 de 40 (7.5 %). Cinco micotoxinas se detectaron en

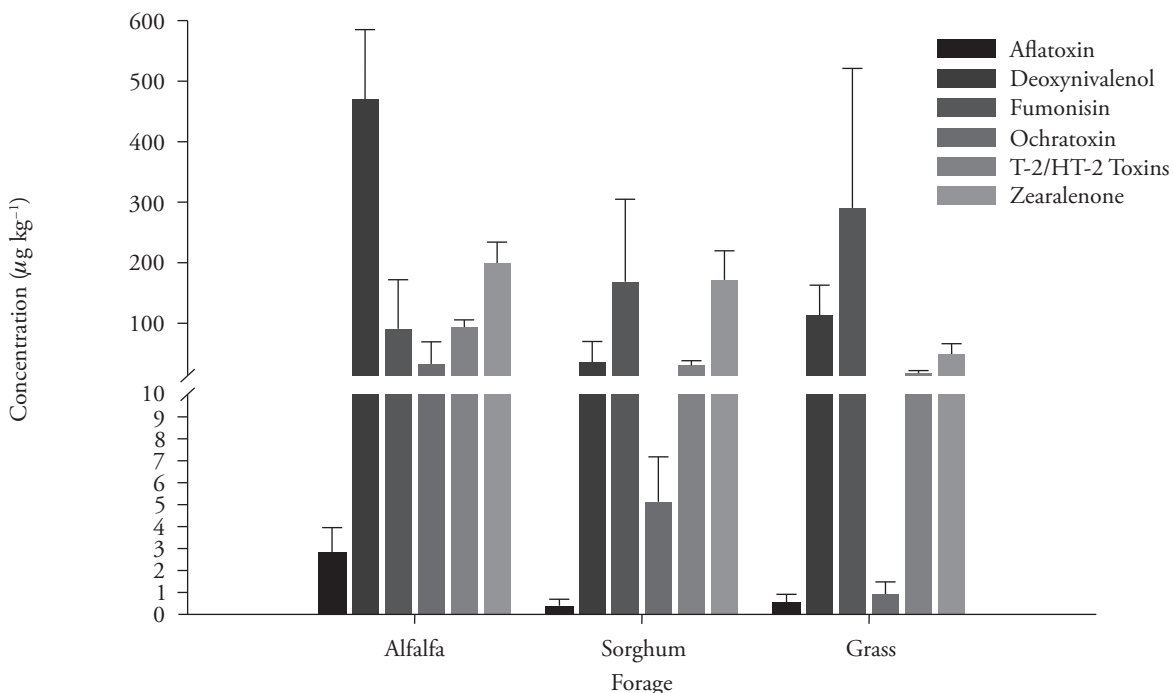


Figure 1. Mycotoxin levels ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of alfalfa, sorghum, and grass samples from Nuevo León, México.

Figura 1. Niveles de micotoxinas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en muestras de alfalfa, sorgo y zacate de Nuevo León, México.

of alfalfa, sorghum, and grass samples, respectively. Only 10 % of the grass samples had two mycotoxins.

### Aflatoxins

These toxins were detected in 62 % of the alfalfa samples, with a mean level of 2.77  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Fewer positive samples were found in the grass (45 %; 0.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and sorghum samples (40 %; 0.36  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Table 1).

### Fumonisin

Fumonisin were found in 54 % of the forage samples, with a range between 0.09 and 0.29  $\text{mg kg}^{-1}$  (Table 1). Grass showed the highest mean level (0.29  $\text{mg kg}^{-1}$ ), followed by sorghum (0.16  $\text{mg kg}^{-1}$ ) and alfalfa (0.09  $\text{mg kg}^{-1}$ ). The Kruskal-Wallis test indicates that there were no significant differences ( $p > 0.05$ ).

35 %, 40 % y 25 % de las muestras de alfalfa, sorgo, y zacate, respectivamente. Cuatro y tres diferentes micotoxinas se detectaron en 25 %, 32 % y 20 % y 2.5 %, 25 %, y 20 % de las muestras de alfalfa, sorgo y zacate, respectivamente. Solo el 10 % de las muestras de zacate tenían dos micotoxinas.

### Aflatoxinas

Estas toxinas se detectaron en el 62 % de las muestras de alfalfa con un nivel promedio de 2.77  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . En el zacate (45 %, 0.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y en el sorgo (40 %, 0.36  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) se encontró un número menor de muestras positivas (Tabla 1).

### Fumonisin

Fumonisin se encontraron en 54 % de las muestras de forraje, con un rango de 0.09 a 0.29  $\text{mg kg}^{-1}$  (Tabla 1). El zacate mostró el mayor nivel promedio

**Table 1. Incidence and concentration of mycotoxins in alfalfa, sorghum, and grass, in Nuevo León, México.**  
**Tabla 1. Incidencia y concentración de micotoxinas en alfalfa, sorgo y zacate, en Nuevo León, México.**

Mycotoxin	Forage	#Samples	Positive samples (%)	Mean ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Aflatoxin	Alfalfa	40	25 (62.5)	2.77 <sup>b</sup>
	Sorghum	40	16 (40)	0.36 <sup>a</sup>
	Grass	40	18 (45)	0.5 <sup>a</sup>
Ochratoxin	Alfalfa	40	39 (97.5)	32.74 <sup>c</sup>
	Sorghum	40	37 (92.5)	5.09 <sup>b</sup>
	Grass	40	21 (52.5)	0.92 <sup>a</sup>
Zearalenone	Alfalfa	40	40 (100)	199.56 <sup>a</sup>
	Sorghum	40	40 (100)	171.68 <sup>a</sup>
	Grass	40	40 (100)	49.14 <sup>b</sup>
T-2/HT-2 Toxins	Alfalfa	40	40 (100)	93.71 <sup>c</sup>
	Sorghum	40	40 (100)	30.2 <sup>b</sup>
	Grass	40	40 (100)	17.6 <sup>a</sup>
Deoxynivalenol	Alfalfa	40	37 (92.5)	470 <sup>c</sup>
	Sorghum	40	10 (25)	35 <sup>a</sup>
	Grass	40	27 (67.5)	112.82 <sup>b</sup>
Fumonisin	Alfalfa	40	22 (55)	91 <sup>a</sup>
	Sorghum	40	25 (62.5)	168.71 <sup>a</sup>
	Grass	40	17 (42.5)	290.5 <sup>a</sup>

Different upper case letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between forages. ♦ Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre forrajes.

### Ochratoxin

This toxin was found in 97 of the 120 (80 %) forage samples, with a range between 0.92 and 32.74  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Similar to aflatoxins, ochratoxin was detected mainly in alfalfa (39/40 samples) and in 37/40 and 21/40 samples of sorghum and grass, respectively (Table 1). Besides, alfalfa showed the highest mean concentration (32.74  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), followed by sorghum (5.09  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and grass (0.92  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### T-2/HT-2 toxins

All 120 forage samples contained T-2/HT-2 toxins and there were significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between forages (Table 1). Thus, higher mean concentrations were detected in alfalfa (93.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) as compared to sorghum (30.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and grass (17.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### Zearalenone

All 120 forage samples contained zearalenone. Higher mean levels were found in alfalfa and sorghum (199  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 171  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively), as compared to grass (41  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Table 1).

### Deoxynivalenol

Alfalfa contained the highest mean level of deoxynivalenol (0.47  $\text{mg kg}^{-1}$ ), followed by grass and sorghum forage (0.11  $\text{mg kg}^{-1}$  and 0.03  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectively) (Table 1).

Aflatoxins are among the mycotoxins with significant impacts in a wide range of agricultural commodities (Robledo *et al.*, 2001). Since aflatoxin contamination is difficult to avoid, limits of aflatoxin content in food and feeds were established in several countries to protect human and animal health (Torres *et al.*, 2010), but the maximum limits vary among countries (Afsah-Hejri *et al.*, 2013). For example, the maximum limits of aflatoxins in cereals for human consumption established by the Mexican Secretary of Health (NOM-188-SSA1-2002; García and Heredia, 2013) and by the United States Environmental Protection Agency are 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , whereas the European Food Safety Authority has set a limit of 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Afsah-Hejri *et al.*, 2013). If this concentration is exceeded, the contaminated

(0.29  $\text{mg kg}^{-1}$ ), seguido por el sorgo (0.16  $\text{mg kg}^{-1}$ ) y alfalfa (0.09  $\text{mg kg}^{-1}$ ). La prueba Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

### Ocratoxina

Esta toxina se encontró en 97 de las 120 muestras de forraje, con un rango de 0.92 a 32.74  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . De manera similar a las aflatoxinas, la ocratoxina se encontró principalmente en las muestras de alfalfa (39/40), también en el sorgo (37/40) y zacate (21/40) (Cuadro 1). Además, la alfalfa mostró el promedio de concentración más alto (32.74  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), luego el sorgo (5.09  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y zacate (0.92  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### Toxinas T-2/HT-2

Todas las muestras tuvieron toxinas T-2/HT-2, pero hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre forrajes (Cuadro 1). La concentración media más alta se detectó en la alfalfa (93.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en comparación con el sorgo (30.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y zacate (17.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### Zearalenona

Las 120 muestras tenían zearalenona. Los niveles promedio más altos se encontraron en la alfalfa y el sorgo (199  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y 171  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente), comparados con el zacate (41  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Cuadro 1).

### Deoxinivalenol

La alfalfa tuvo el nivel promedio más alto de deoxinivalenol (0.47  $\text{mg kg}^{-1}$ ), seguida por el zacate y el sorgo (0.11  $\text{mg kg}^{-1}$  y 0.03  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente) (Cuadro 1).

Las aflatoxinas están entre las micotoxinas con un gran impacto en un rango amplio de productos agrícolas (Robledo *et al.*, 2001). Dado que la contaminación por aflatoxina es difícil de evitar, se establecieron límites en su contenido en alimentos y pienso en muchos países para proteger la salud de animales y humanos (Torres *et al.*, 2010), pero los límites máximos varían en cada país (Afsah-Hejri *et al.*, 2013). Por ejemplo, el límite máximo de aflatoxinas en cereales para consumo humano establecido por la Secretaría de Salud de México (NOM-188-SSA1-2002; García y Heredia, 2013) y por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos es 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , mien-

cereal can be used only for animal feed and there are maximum limits ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ): poultry 100, pork 100-200, cattle 100-300 (García and Heredia, 2013).

In Vietnam, a survey was carried out, between 2004-2011, on corn and it showed that 27 % of 10 172 samples were contaminated with aflatoxins ( $58 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; Skrinjar *et al.*, 1992). A similar survey of stored sorghum in Brazil showed aflatoxin B<sub>1</sub> ( $7-33 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in 12.8% of 104 samples (Charoenpornsook and Kavisarasai, 2006). In Thailand, aflatoxin B<sub>1</sub> ( $7.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) was detected in 23 of 25 (92 %) feedstuff samples (Buckle, 1983); whereas Amigot *et al.* (2006) detected aflatoxin in alfalfa, maize, and sorghum:  $3.75 \pm 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $2.56 \pm 0.51 \mu\text{g kg}^{-1}$ , and  $2.82 \pm 1.51 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. These results are similar to the aflatoxin concentration ( $1.21 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) found in 49 % of the samples in our study, and its levels were higher in alfalfa, followed by sorghum and grass. Aflatoxin was found in many samples, but the levels were within the range allowed by Mexican and other international regulations for animal feeds.

In the US, the maximum limit for total fumonisins (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>+FB<sub>3</sub>) in products used for human consumption is 2-4 mg kg<sup>-1</sup> (Streit *et al.*, 2012), for cattle feed is 60 mg kg<sup>-1</sup> and for poultry feed is 100 mg kg<sup>-1</sup> (Driehuis *et al.*, 2008a; Bhat *et al.*, 2010; Afsah-Hejri *et al.*, 2013). Studies carried out on animal feed in Malaysia (Petzinger and Weidenbach, 2002), on cereals and feed samples in Croatia (Hussein and Brasel, 2001), and on feeds and feed ingredients in Asia (Bhatnagar and García, 2013) detected low levels ( $0.261-2.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $2.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , and  $0.39-1.01 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectively) of these toxins. Similarly, in our study, low levels ( $0.09-0.290 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of fumonisins were detected in the forage samples analyzed.

Cereals and other agricultural products are the most prominent ochratoxin source in the human diet, and carryover of this toxin from feeds to animal food products can occur. Thus, aflatoxins in poultry can have a carryover ratio of 0.02 % in eggs, and in ruminants 1 % to 3 % in milk (Driehuis *et al.*, 2008a; Peel *et al.*, 2011, Volkel *et al.*, 2011). Regulations in several countries show that the maximum permissible levels of ochratoxin in raw cereals and cereal products for human consumption are  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  and  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively (Naicker *et al.*, 2007). Variations in the frequencies and concentrations of this toxin are reported in some countries. A study in South Africa

tras que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria estableció un límite de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Afsah-Hejri *et al.*, 2013). Si se excede esta concentración, el cereal contaminado sólo se puede usar para alimentar animales, aunque también hay límites máximos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ): aves de corral 100, puercos 100-200, ganado 100-300 (García y Heredia, 2013).

Entre 2004 y 2011 se realizó una investigación sobre el maíz en Vietnam y 27 % de 10 172 muestras estaban contaminadas con aflatoxinas ( $58 \mu\text{g kg}^{-1}$ , Skrinjar *et al.*, 1992). Un estudio similar sobre el sorgo en Brasil mostró aflatoxina B<sub>1</sub> ( $7-33 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en 12.8 % de 104 muestras (Charoenpornsook and Kavisarasai, 2006). En Tailandia se detectó aflatoxina B<sub>1</sub> ( $7.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en 23 de 25 (92 %) muestras de alimento (Buckle, 1983); mientras que Amigot *et al.* (2006) detectaron aflatoxina en alfalfa, maíz, y sorgo:  $3.75 \pm 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $2.56 \pm 0.51 \mu\text{g kg}^{-1}$ , y  $2.82 \pm 1.51 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados son similares a la concentración de aflatoxinas ( $1.21 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en el 49 % de las muestras de nuestro estudio, y esos niveles fueron más altos en la alfalfa, seguida del sorgo y el zacate. Aflatoxina se encontró en muchas muestras, pero los niveles estaban dentro de los parámetros permitidos por las regulaciones mexicanas e internacionales para la alimentación de animales.

En EE.UU., el límite máximo total para fumonisinas (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>+FB<sub>3</sub>) en productos de consumo humano es 2-4 mg kg<sup>-1</sup> (Streit *et al.*, 2012), para el consumo de ganado es 60 mg kg<sup>-1</sup>, para aves de corral es 100 mg kg<sup>-1</sup> (Driehuis *et al.*, 2008a; Bhat *et al.*, 2010; Afsah-Hejri *et al.*, 2013). Estudios realizados en pienso en Malasia (Petzinger and Weidenbach, 2002), en cereales y pienso en Croacia (Hussein and Brasel, 2001), y en pienso y sus ingredientes en Asia (Bhatnagar and García, 2013) detectaron niveles bajos ( $0.261-2.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $2.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , and  $0.39-1.01 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente) de estas toxinas. De manera similar, en nuestro estudio se detectaron niveles bajos ( $0.09-0.290 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de fumonisinas en las muestras de forraje analizadas.

Los cereales y otros productos agrícolas son la fuente más prominente de ocratoxina en la dieta humana, y esta toxina puede pasar del pienso a los productos alimenticios de origen animal. Así, las aflatoxinas en las aves de corral pueden tener un índice de traspaso del 0.02 % hacia los huevos, y en rumiantes del 1 % al 3 % hacia la leche (Driehuis *et al.*, 2008a; Peel *et al.*, 2011, Volkel *et al.*, 2011). Las



showed a mean of  $5.2 \mu\text{g kg}^{-1}$  of ochratoxin A in 3 of 7 grass samples (Lincy *et al.*, 2008). A higher incidence (30 % of samples) and levels ( $10.48\text{-}12.35 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) of this toxin were found in animal feedstuff from Thailand (Charoenpornsook and Kavisarasai, 2006). In Yugoslavia, concentrations of this toxin varied from traces to  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$  in feed samples of hay, dried and fresh alfalfa, pelleted pulp, and silage (Skládanka *et al.*, 2010). In our study, levels of ochratoxin A ranged from 0.9 to  $32.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ , and the mean was  $12.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ , which exceeded the maximum limit ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) set for ochratoxin in cereal products according to EU legislation.

Corn, maize, wheat, barley, rice, oats, millet, and sorghum can be contaminated by zearalenone (Zain, 2011), whereas T-2/HT-2 toxin contamination is rare on wheat and maize. However, in our study, zearalenone and T-2/HT-2 toxins were detected in all samples analyzed of alfalfa, sorghum and grass (Table 1).

Current regulations regarding the maximum limits of zearalenone in foods and feeds in countries vary between no regulations to more than  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Afsah-Hejri *et al.*, 2013; Bhatnagar and García, 2013). Values less than  $300 \mu\text{g kg}^{-1}$  in feeds are recommended for dairy cattle (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008), although ruminants are more resistant to the negative effects of mycotoxins (Wu *et al.*, 2014). *In vivo* studies showed that zearalenone is rapidly metabolized in animals and humans and eliminated mainly as water-soluble glucuronides (García and Heredia, 2006). Therefore, consumption of low-dose zearalenone-contaminated feedstuffs by dairy cows does not pose a human health hazard. However, animal health and their food products can be altered when ruminants consume feed contaminated with mycotoxin for long periods (García and Heredia, 2006; Afsah-Hejri *et al.*, 2013). Feed contamination by this toxin is reported in several countries. Samples of sorghum imported into Japan from 2001 to 2006 had a zearalenone contamination rate of 52.5 % (84/160), with values of  $60\text{-}7,260 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Aoyama *et al.*, 2009). Cow feedstuffs in Argentina were contaminated with this toxin ( $1,200\text{-}3,006 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) according to Zain (2011), whereas in South Africa, all samples of pasture grasses contained mycotoxin (mean,  $2,500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), which is higher than the allowable concentration for dairy and beef cattle (Lincy *et al.*, 2008). In our study, this toxin was

regulaciones en varios países muestran que los niveles máximos permitidos de ocratoxinas en cereales y en productos de cereal para consumo humano son de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  y  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (Naicker *et al.*, 2007). En algunos países se reportan variaciones en la frecuencia y concentración de esta toxina. Un estudio en Sudáfrica mostró un promedio de  $5.2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de ocratoxina A en 3 de 7 muestras (Lincy *et al.*, 2008). En Tailandia se encontró una mayor incidencia (30 % de las muestras) y niveles mayores ( $10.48\text{-}12.35 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) de esta toxina en el pienso (Charoenpornsook and Kavisarasai, 2006). En Yugoslavia, las concentraciones variaron hasta en  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$  en muestras de heno, alfalfa seca y fresca, pulpa de remolacha granulada y en ensilaje (Skládanka *et al.*, 2010). En nuestro estudio, los niveles de ocratoxina A oscilaron de 0.9 a  $32.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ , y el promedio fue  $12.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ , que excede el límite máximo ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) establecido para ocratoxina en productos de cereal de acuerdo con la legislación en EE.UU.

Maíz, trigo, cebada, arroz, avena, mijo y sorgo se pueden contaminar con zearalenona (Zain, 2011), mientras que la contaminación por toxinas T-2/HT-2 es rara en trigo y maíz. Pero en nuestro estudio se detectaron toxinas T-2/HT-2 y zearalenona en todas las muestras analizadas de alfalfa, sorgo y zacate (Tabla 1).

Las regulaciones actuales sobre los límites máximos de zearalenona en alimentos y pienso varían en cada país, desde no regulaciones hasta más de  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Afsah-Hejri *et al.*, 2013; Bhatnagar and García, 2013). Valores menores a  $300 \mu\text{g kg}^{-1}$  se recomiendan en el alimento para vacas lecheras (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008), a pesar de que los rumiantes son más resistentes a los efectos negativos de micotoxinas (Wu *et al.*, 2014). Estudios *in vivo* mostraron que la zearalenona se metaboliza con rapidez en humanos y animales y se elimina principalmente como glucuronidos solubles en agua (García and Heredia, 2006). Por lo tanto, el consumo de dosis bajas de alimento contaminado con zearalenona en vacas lecheras no es un riesgo de salud para el humano. Pero la salud de los animales y sus productos alimenticios se pueden alterar cuando los rumiantes consumen alimentos contaminados con micotoxinas por largos periodos (García and Heredia, 2006; Afsah-Hejri *et al.*, 2013). El pienso contaminado por estas toxinas se reporta en varios países. Muestras de sorgo importado de Japón de 2001 a 2006 tuvieron un índice de contaminación

detected in all samples, but the concentrations were lower ( $49.1-199.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Data regarding the prevalence of T-2/HT-2 toxins in commodities and feed in Mexico are limited (García and Heredia, 2013). In a study performed in Nayarit, only one sample (5 %) of forage maize was contaminated ( $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) according to Reyes-Velázquez *et al.*, (2008). However, in our study there was 100 % incidence of T-2/HT-2 toxins in the samples and higher concentrations ( $17.6-93.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Our results are similar to those reported in: Croatia,  $6.09-67.68 \mu\text{g kg}^{-1}$  in 76 % of the feed samples; Thailand,  $6.91 \mu\text{g kg}^{-1}$  in all the feed samples (Buckle, 1983), in India,  $12-130 \mu\text{g kg}^{-1}$  in all the sorghum samples (Klarić *et al.*, 2009).

Deoxynivalenol is the mycotoxin most commonly found (20-100 %) in forage feeds (particularly in corn) and in ingredients used in concentrate feeds (Driehuis *et al.*, 2008b; Skrinjar *et al.*, 1992). In our study, deoxynivalenol was found in alfalfa (92.5 %), sorghum (25 %), and grass (67.5 %). Although a high incidence of deoxynivalenol was found, the levels were relatively low ( $0.035-0.47 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and at allowable levels ( $0.5-1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), according to Aoyama *et al.* (2009). Our results are similar to those reported in Europe for feed samples of alfalfa ( $0.187 \pm 0.059 \text{ mg kg}^{-1}$ ), maize ( $0.167 \pm 0.051 \text{ mg kg}^{-1}$ ), and sorghum ( $0.029 \pm 0.015 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Amigot *et al.*, 2006) as well as compound feed ( $0.348-2.40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (da Silva *et al.*, 2000).

In our study, all samples showed two or more mycotoxins, which is similar to results from other countries, where two or more mycotoxins were found in 75-100 % of samples (Streit *et al.*, 2012). The co-occurrence of multiple mycotoxins observed in our study could be due to: 1) most fungi are able to simultaneously produce various mycotoxins, 2) commodities can be contaminated by several fungi, and 3) feed can be composed by various contaminated commodities (Streit *et al.*, 2012). The fact that a specific feed carries more than one mycotoxin could affect animal health even at low doses, and risk assessment analysis must be carried out in order to reduce or eliminate human harm by its exposure.

## CONCLUSION

To the best of our knowledge, this is the first study to provide data regarding the status

por zearalenona de 52.5 % (84/160), con valores de  $60-7260 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Aoyama *et al.*, 2009). De acuerdo con Zain (2011), piensos para vaca en Argentina estaban contaminados con esta toxina ( $1200-3006 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), y en Sudáfrica todas las muestras de pastura tenían micotoxinas (un promedio de  $2,500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), que es una concentración más alta a la permitida para vacas y reses (Lincy *et al.*, 2008). En nuestro estudio, esta toxina se encontró en todas las muestras, pero la concentración fue más baja ( $49.1-199.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

En México, la información de la prevalencia de toxinas T-2/HT-2 en productos y en pienso es limitada (García y Heredia, 2013). En un estudio realizado en Nayarit, sólo una muestra (5 %) de forraje de maíz estaba contaminada ( $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) según Reyes-Velázquez *et al.* (2008). Sin embargo, en nuestro estudio hubo una incidencia del 100 % en toxinas T-2 / HT-2 en las muestras y una concentración más alta ( $17.6-93.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Nuestros resultados son similares a los reportados en Croacia, con  $6.09-67.68 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el 76 % de las muestras de pienso; Tailandia, con  $6.91 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el 100 % de las muestras de pienso (Buckle, 1983); e India, con  $12-130 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el 100% de las muestras de sorgo (Klarić *et al.*, 2009).

El deoxinivalenol es la micotoxina más común (20-100 %) en forrajes (en particular en el maíz) y en ingredientes de pienso concentrado (Driehuis *et al.*, 2008b; Skrinjar *et al.*, 1992). En nuestro estudio, el deoxinivalenol se encontró en la alfalfa (92.5 %), sorgo (25 %) y zacate (67.5 %). A pesar de una incidencia alta de deoxinivalenol, los niveles fueron relativamente bajos ( $0.035-0.47 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y dentro de parámetros aceptables ( $0.5-1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), de acuerdo con Aoyama *et al.* (2009). Nuestros resultados son similares a los reportados en Europa en muestras de alfalfa ( $0.187 \pm 0.059 \text{ mg kg}^{-1}$ ), maíz ( $0.167 \pm 0.051 \text{ mg kg}^{-1}$ ), y sorgo ( $0.029 \pm 0.015 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Amigot *et al.*, 2006), así como en piensos compuestos ( $0.348-2.40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (da Silva *et al.*, 2000).

En nuestro estudio se encontraron dos o más micotoxinas en todas las muestras, que es similar a los resultados de otros países, donde hubo dos o más micotoxinas en 75-100 % de las muestras (Streit *et al.*, 2012). La ocurrencia de múltiples micotoxinas en nuestro estudio se puede deber a: 1) la mayoría de hongos pueden producir de manera simultánea varias micotoxinas, 2) los productos pueden estar contaminados por varios hongos y 3) el pienso puede

of mycotoxin contamination of forage used for animal feedstuffs in the state of Nuevo León. Most mycotoxins were detected at levels allowed according to international regulations. However, most samples were contaminated with more than two mycotoxins, which could be a risk for animal and human health. These data show the need to establish appropriate control measures to reduce the risk of contamination of feeds, particularly when mixtures with forage susceptible to fungal contamination are used.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Project funding was provided by the Fundación Produce Nuevo León, A.C. grant 19-2012-00.

#### LITERATURE CITED

- Afsah-Hejri, L., S. Jinap, P. Hajeb, S. Radu, and S. Shakibzadeh. 2013. A Review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. *Compr. Rev. Food. Sci. F* 12: 629-651.
- Alonso, V. A., C. M. Pereyra, L. A. Keller, A. M. Dalcerro, C. A. Rosa, S. M. Chiacchiera, and L. R. Cavaglieri. 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 115: 637-643.
- Améndola, R., E. Castillo, and P.A. Martínez. 2006. posting date. Country Pasture/Forage Resource Profiles México. <http://www.fao.org/ag/AGP/agpc/doc/Counprof/Mexico/Mexico.htm>. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (Consulta: Julio 2015).
- Amigot, S. L., C. L. Fulgueira, H. Bottai, and J. C. Basílico. 2006. New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biol. Tec.* 41: 215-224.
- Aoyama, K., E. Ishikuro, M. Nishiwaki, and M. Ichinoe. 2009. Zearalenone contamination and the causative fungi in sorghum. *J. Food. Hyg. Soc. Jpn.* 50: 47-51.
- Bhat, R., R. V. Rai, and A. Karim. 2010. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr. Rev. Food. Sci. F* 9: 57-81.
- Bhatnagar, D., and S. García. 2013. Aflatoxins and *Aspergillus flavus*. In: Labbe, R. G., and S. Garcia (eds). *Guide to Foodborne Pathogens*, second edition. Wiley Blackwell, New York. pp: 257-272.
- Binder, E., L. Tan, L. Chin, J. Handl, and J. Richard. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137: 265-282.
- Bryden, W. L. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173: 134-158.
- Buckle, A. E. 1983. The occurrence of mycotoxins in cereals and animal feed-stuffs. *Vet. Res. Commun.* 7: 171-186.
- Charoenpornsook, K., and P. Kavisarasai. 2006. Mycotoxins in animal feedstuffs of Thailand. *KMITL Sci. Technol. J.* 6: 25-28.
- estar compuesto por varios productos contaminados (Streit *et al.*, 2012). El hecho de que un pienso específico contenga más de una micotoxina puede afectar la salud de los animales, incluso en dosis pequeñas, y se debe realizar un análisis del riesgo para reducir o eliminar el daño al humano por su exposición.

#### CONCLUSIÓN

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que provee información referente al estado de contaminación por micotoxinas en forraje usado para animales en el estado de Nuevo León. La mayoría de las micotoxinas se detectaron dentro de niveles admisibles de acuerdo a regulaciones internacionales. Sin embargo, la mayoría de las muestras estuvieron contaminadas con más de dos micotoxinas, lo que podría representar un riesgo de salud para animales y humanos. Esta información muestra la necesidad de establecer medidas de control apropiadas para reducir el riesgo de alimento contaminado, en particular cuando se usan mezclas con forraje susceptible a contaminación micótica.

—Fin de la versión en Español—

-----\*-----

- da Silva, J. B., C. R. Pozzi, M. A. B. Mallozzi, E. M. Ortega, and B. Correa. 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> during storage of Brazilian sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4352-4356.
- Driehuis, F., M. C. Spanjer, J. M. Scholten, and M. C. Te Giffel. 2008a. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Addit. Contam. B* 1: 41-50.
- Driehuis, F., M. C. Spanjer, J. M. Scholten, and M. C. Te Giffel. 2008b. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J. Dairy Sci.* 91: 4261-4271.
- Duarte, S. C., A. Pena, and C. M. Lino. 2010. Ochratoxin a in Portugal: a review to assess human exposure. *Toxins* 2: 1225-1249.
- García, S., and N. Heredia. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia* 162: 255-264.
- García, S., and N. Heredia. 2013. Aflatoxins: an overview. In: Dixon, J. E. (ed). *Aflatoxin Control in Animal Feeds with Adsorbent Smectite in Bentonite* American Society for

- Agronomy and Soil Science Society of America, Madison. pp: 1-10
- Hussein, H. S., and J. M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134.
- Klarić, M., Z. Cvetnić, S. Pepeljnjak, and I. Kosalec. 2009. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 60: 427-434.
- Lincy, S. V., R. Latha, A. Chandrashekar, and H. K. Manonmani. 2008. Detection of toxigenic fungi and quantification of type A trichothecene levels in some food and feed materials from India. *Food Control* 19: 962-966.
- Naicker, D., G. Marais, H. Van den Berg, and M. Masango. 2007. Some fungi, zearalenone and other mycotoxins in chicken rations, stock feedstuffs, lucerne and pasture grasses in the communal farming area of Rhenosterkop in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 78: 69-74.
- Olsen, M., N. Jonsson, N. Magan, J. Banks, C. Fanelli, A. Rizzo, A. Haikara, A. Dobson, J. Frisvad, and S. Holmes. 2006. Prevention of ochratoxin A in cereals in Europe. *In: Hocking, A. D., J. I. Pitt, R. A. Samson, and U. Thrane (eds). Advances in Food Mycology.* Springer. pp: 317-342.
- Peel, D. S., K. H. J. Mathews, and R. J. Johnson. 2011. Trade, the expanding Mexican beef industry, and feedlot and stocker cattle production in Mexico. Department of Agriculture Economic Research Service Report LDP-M-206-01, United States.
- Pereira, V., J. Fernandes, and S. Cunha. 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: a review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends Food Sci. Tech.* 36: 96-136.
- Petzinger, E., and A. Weidenbach. 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livest. Prod. Sci.* 76: 245-250.
- Reyes-Velázquez, W. P., V. Isaías-Epinoza, F. Rojo, C. Jiménez-Plasencia, E. de Lucas Palacios, and J. Hernández-Góbora. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 182-185.
- Robledo, M. L., S. Marín, and A. J. Ramos. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Rev. Iberoam. Micol.* 18: 141-144.
- Roze, L. V., S.-Y. Hong, and J. E. Linz. 2013. Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4: 293-311.
- Skládanka, J., J. Nedělník, V. Adam, P. Doležal, H. Moravcová, and V. Dohnal. 2010. Forage as a primary source of mycotoxins in animal diets. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8: 37-50.
- Skrinjar, M., R. D. Stubblefield, and I. F. Vujčić. 1992. Ochratoxigenic moulds and ochratoxin A in forages and grain feeds. *Acta Vet. Hung.* 40: 185-190.
- Streit, E., G. Schatzmayr, P. Tassis, E. Tzika, D. Marin, I. Taranu, C. Tabuc, A. Nicolau, I. Aprodu, and O. Puel. 2012. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. *Toxins* 4: 788-809.
- Streit, E., K. Naehrer, I. Rodrigues, and G. Schatzmayr. 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J. Sci. Food Agric.* 93: 2892-2899.
- Torres, A., M. Ramirez, and S. Chulze. 2010. *Fusarium* and Fumonisin in Maize in South America. *In: Rai, M., and A. Varma (eds). Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons.* Springer Berlin Heidelberg. pp: 179-200.
- Torres, A. M., G. G. Barros, S. A. Palacios, S. N. Chulze, and P. Battilani. 2014. Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Res. Int.* 62: 11-19.
- Völkel, I., E. Schröer-Merker, and C. P. Czerny. 2011. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. *Food Nut. Sci.* 2: 852-867.
- Wood, G. 1992. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J. Anim. Sci.* 70: 3941-3949.
- Wu, F., J. D. Groopman, and J. J. Pestka. 2014. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5: 351-372.
- Zain, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 15: 129-144.